

Aus der Universitäts-Kinderklinik Zürich

(Direktor: Prof. A. PRADER)

Arbeit unter der Leitung von Prof. W. H. HITZIG

# Untersuchungen zur Transferrin-Bestimmung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der Universität Zürich

vorgelegt von

**Manfred Norbert Bambach**

von Darmstadt (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. H. HITZIG

Zürich 1966

Buchdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg/Deutschland

Klinische Wochenschrift 1966, Heft 22

## **Untersuchungen zur Transferrin-Bestimmung**

M. N. BAMBACH

Immunochemisches Laboratorium (Leiter: Prof. W. H. HITZIG) der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. A. PRADER)



### Einleitung

Das Transferrin, auch Siderophilin,  $\beta_{1s}$ -Globulin, eisenbindendes Globulin oder Protein genannt, ist ein klar definiertes Protein des menschlichen Serums, das praktisch den gesamten Eisentransport besorgt. Es wurde von SCHADE [22] und LAURELL [12] gleichzeitig isoliert und von KOEHLIN [13] in kristallisierter Form dargestellt. In der Elektrophorese wandert es mit den  $\beta_1$ -Globulinen.

Das Molekulargewicht beträgt 89000 [24]. 1 Mol Transferrin bindet 2 Mole Eisen<sup>+++</sup> gemeinsam mit 2 Molen Kohlensäure [2].

Bei einem Atomgewicht des Eisens von 55,85 ergibt sich folgende Umrechnungsformel:

Totale Eisenbindungskapazität (in  $\gamma$ -% Fe angegeben)  $\times 0,8$  = Transferrin (in mg-%).

Das Transferrin kann auch andere Metalle binden, jedoch ist die Eisenbindung  $10^7$  mal fester als z.B. die Kupferbindung. Der Eisen-Transferrinkomplex ist nur stabil bei einem pH über 7,2 [14, 20, 21], bei pH 4,5 ist er praktisch völlig dissoziiert.

Es gibt mehrere genetisch bestimmte Transferrin-Varianten [5], die in funktioneller Hinsicht gleichwertig erscheinen. Auch kongenitale oder erworbene extreme Verminderung ist beschrieben [7, 11]; neben anderen schweren Krankheitssymptomen ist dabei vor allem der Eisentransport und die Eisenspeicherung gestört.

Für den Kliniker ist die Bestimmung des Transferrins von Interesse für die Differenzierung zwischen Eisenmangel- und Infektanämie, bei den eisenrefraktären hypochromen Anämien, bei Hämochromatosen, bei Leberschäden und bei renalen und gastrointestinalen Proteinverlust-Syndromen.

Es gibt prinzipiell zwei Wege, das Transferrin zu bestimmen:

1. Indirekt, was das bisher übliche Verfahren ist, durch Bestimmung des Serum-Eisens und der ungesättigten Eisen-Bindungs-Kapazität, in dieser Arbeit im weiteren als UEBK bezeichnet (unsaturated iron binding capacity im englischen Sprachgebrauch = UIBC) oder der totalen Eisenbindungskapazität, kurz TEBK (TIBC der Angelsachsen).

2. Direkte Bestimmung des Proteins auf immunologischem Wege. Prinzipiell ist dieses Vorgehen bedeutend einfacher. Es setzt aber voraus, daß spezifisches Antiserum zur Verfügung steht [9, 10].

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von drei Modifikationen der immunologischen Bestimmungstechnik mit denen der chemischen Bestimmung der TEBK verglichen. Die TEBK ergibt sich aus der Summe des Serum-Eisen- und des UEBK-Wertes, die mit den von SCHADE angegebenen Methoden bestimmt wurden.

### Material und Reagentien

1. 43 Seren gesunder, jüngerer Erwachsener; 18 Seren hämatologisch gesunder Kinder im Alter von 4 Wochen bis 10 Jahren; 25 Seren hämatologisch kranker Kinder.

Ein großer Teil der Seren wurde aus äußeren Gründen vor Ausführung der Bestimmungen mehrere Wochen lang tiefgefroren aufbewahrt.

2. Spezifisches Anti-Transferrin-Antiserum wurde folgendermaßen hergestellt: Als Antigen diente ein antigenetisch hochgradig reines Transferrinpräparat der Behringwerke Marburg in 1%iger Lösung. 2 Kaninchen wurden nach folgendem Schema immunisiert: Zuerst 3 i.v. Injektionen von je 10 mg Antigen mit Freundschem Adjuvans in wöchentlichen Intervallen. Nach einer dreiwöchigen Pause 4 i.m. Injektionen von je 10 mg Antigen mit Aluminiumhydroxyd in wöchentlichen Abständen. Nach einer Testblutung wurden die Tiere ausgeblutet, das Serum nach Gerinnung abzentrifugiert, bei 56° C  $\frac{1}{2}$  Std lang inaktiviert, dann wurden alle Proben gemischt und nach Zusatz von Merthiolat 1:10000 in 15–20 ml Portionen tiefgefroren.

Die Prüfung des Antiserums gegen Vollserum ergab sowohl in der Immunelektrophorese als auch im Ouchterlony-Test nur eine einzige Präzipitatlinie, die antigenetische Identität mit dem verwendeten Antigen aufweist. Das Antiserum ist daher ohne jede Absorption hochgradig spezifisch für Transferrin.

3. Zur Erstellung von Eichkurven für quantitative immunologische Bestimmungen wurden Lösungen desselben Transferrinreinpräparates der Behringwerke von 500–6,3 mg-% hergestellt. Als Verdünnungsflüssigkeit wurde 5%ige Substanz (= Polyvinylpyrrolidon-)Lösung verwendet, um stets dieselbe Viskosität der Eichlösungen zu gewährleisten.

4. Mikrohämatokrit-Capillarröhrchen von 7,5 cm Länge und einem Durchmesser von 1,3–1,5 mm (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia 5).

5. Pyrexgläseröhrchen von 5–6 cm Länge und einem inneren Durchmesser von 3 mm.

6. Reagentien: 6.1. Phosphatpuffer pH 7,5 nach SCHULTZE und SCHWICK [23]: 11,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 9,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in je 1 l physiologischer Kochsalzlösung auflösen. Zu 85,2 ml der M/15  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung 14,8 ml der M/15  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung geben.

6.2. 1%iger Agar, hergestellt aus 4%igem Stammagar durch Verdünnen mit aqua dest.

6.3. 1%iger Agar in Phosphatpuffer pH 7,5 (Reagens 6.1).

6.4. Boratpuffer pH 8,6; 2/10 M hergestellt aus: Borsäure 24,8 g/2 l; Borax 76,28 g/1 l. Die 2/10 M Stammlösung wird vor Benutzung mit aqua dest. auf 1/10 M verdünnt.

Die folgenden Lösungen 6.5 bis 6.11 müssen aus eisenfreien pro analysi Präparaten hergestellt werden.

6.5. 1 M Natriumphosphatpuffer pH 5,3 aus 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ - und 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung.

6.6. Zu 100 ml von Reagens 6.5 gebe man als Eisenreduktionsmittel 1 g Ascorbinsäure und 1 g Natrium Bisulfit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Diese Lösung muß gekühlt aufbewahrt und alle 2–3 Wochen erneuert werden. Ist sie zu alt, so sinkt ihre Reduktionskraft, und man bestimmt zu niedrige Eisenwerte.

6.7. 0,1%ige 2,2',2''-Terpyridin-Lösung: 100 mg Terpyridin in 4 ml absolutem Äthanol lösen und mit aqua bidest. auf 100 ml auffüllen unter Zugabe von so viel 0,2 N HCl, daß das Reagens gerade in Lösung bleibt. (Man benötigt nur wenige Tropfen von der Säure.)

6.8. Eisenreagens A zur Benutzung beim Leerwert aus: 6 Teilen aqua bidest. und 4 Teilen Reagens 6.6.

6.9. Eisenreagens B zur Benutzung bei der Testprobe: 4 Teile aqua bidest., 4 Teile Reagens 6.6 und 2 Teile Reagens 6.7. Reagens 6.8 und 6.9 werden vor jeder Bestimmung neu angesetzt.

6.10. 1 M Tris-Puffer [tris(hydroxymethyl)aminomethan] mit 1 N HCl auf pH 8,5 eingestellt. (Zu 100 ml Pufferlösung 29 ml der 1 N HCl geben.)

6.11. 1%ige „Metol“-Lösung (p-methylaminophenol sulfat) mit 3% Na-Pyrosulfit stabilisiert.

6.12. Eisenstammlösung zur Erstellung einer Eichkurve, die 1 mg Fe/ml enthält: 351,1 mg Mohrsches Salz  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Molgewicht 392,158) werden in einer minimalen Menge 10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und dann mit aqua bidest. auf 50 ml

aufgefüllt. Die Grundlösung wird mit 0,01 n HCl derart weiterverdünnt, daß sich Lösungen mit einem Gehalt von 10 bis 500  $\gamma$ -% Eisen ergeben. Man sollte zum Ausgleich eventueller Wäge- oder Verdünnungsfehler mit drei Stammlösungen arbeiten.

Alle für die Eisenbestimmungen benutzten Glaswaren müssen über Nacht in konzentrierte Salpetersäure, 1:1 mit aqua dest. verdünnt, eingelegt und anschließend gründlich mit aqua dest. und zum Schluß mit aqua bidest. gespült werden.

Folgende Instrumente wurden benutzt: 1. Lupen-Mikroskop mit einem auf 0,05 mm geteilten Maßstab auf dem Objektisch; 2. Mikrohämatokrit-Zentrifuge Ecco; 3. Photometer Eppendorf; 4. Spektrophotometer Beckman B.

Methoden

a) Serum-Eisen [20, 21]. Prinzip: Durch Ansäuern des Serums wird das an Transferrin gebundene Eisen als  $Fe^{+++}$  freigesetzt, mit Ascorbinsäure und Bisulfit zu  $Fe^{++}$  reduziert und an das Chromogen Terpyridin komplex gebunden. Die Farb-Intensität des Fe-Chromogen-Komplexes wird photometrisch gemessen.

Procedere: Testansatz: 0,5 ml Serum und 0,5 ml Reagens 6.9. Blindwert: 0,5 ml Serum und 0,5 ml Reagens 6.8. Reagentienblindwert: 0,5 ml Reagens 6.8 und 0,5 ml aqua bidest. gegen 0,5 ml Reagens 6.9 und 0,5 ml aqua bidest. (Bei Mangel an Serum kann man gut auch mit den halben Mengen arbeiten.)

Gut mischen und beide Ansätze 20 min lang bei 45° C inkubieren. Am Photometer Eppendorf wird mit Filter 546 nm unter Benutzung von Mikrocuvetten der Testansatz gegen den Blindwert photometriert. Der Reagentienblindwert hatte bei uns konstant eine Extinktion von  $0,025 \pm 0,001$ . Die Extinktion des Testansatzes, vermindert um die Extinktion des Reagentienblindwertes, entspricht, auf der Eichkurve abgelesen, der Serum-Eisen-Konzentration in  $\gamma$ -%. Die Eichkurve, hergestellt mit reinen Eisenlösungen (Reagens 6.12), ergibt für eine 100  $\gamma$ -%ige Eisenlösung in der Cuvette bei 1 cm Schichtdicke und bei Verwendung von Filter 546 nm im Photometer Eppendorf eine Extinktion von 0,204 (Abb. 1).

b) Ungesättigte Eisen-Bindungs-Kapazität [20, 21]. Prinzip: Einer Serumprobe, deren pH mit Tris-Puffer (Reagens 6.10) auf 8,3 gebracht wird, wird eine bekannte Eisenmenge zugesetzt, die genügend groß ist, um das gesamte Transferrin zu 100% mit Eisen zu sättigen. Das im Überschuß über die UEBK zugesetzte Eisen wird zu  $Fe^{++}$  reduziert, an ein Chromogen gebunden und photometrisch erfaßt. Zugesetzte Eisenmenge minus vom Chromogen erfaßte Eisenmenge entspricht der UEBK der Serumprobe.

Procedere: Testansatz: 0,5 ml Serum + 0,2 ml Tris-Puffer (Reagens 6.10) + 0,1 ml einer Eisenlösung, die 20  $\gamma$  Eisen/ml enthält (Reagens 6.12). Mit Parafilm bedecken und 10 min lang bei 45° C inkubieren. Dann 0,1 ml Metol (Reagens 6.11) + 0,1 ml Terpyridinlösung (Reagens 6.7) zusetzen, gut mischen, wieder mit Parafilm bedecken und 30 min lang bei 45° C inkubieren. Im Photometer Eppendorf mit Filter 546 nm gegen einen Blindwert photometrieren, der genauso wie der Testansatz behandelt wird, dem jedoch an Stelle des Chromogens 0,1 ml aqua bidest. zugesetzt wird. Die Zeitdauer der zweiten Inkubation ist genau einzuhalten.

Um die Menge des zugesetzten Eisens nochmals zu kontrollieren, haben wir bei jeder Bestimmungsserie einen zweiten Testansatz mitlaufen lassen, der sich vom oben geschilderten nur dadurch unterscheidet, daß an Stelle von 0,5 ml Serum 0,5 ml aqua bidest. verwendet wird. Dieser Ansatz muß für mindestens 1 Std bei 45° C inkubiert werden, um alles Eisen an das Chromogen zu binden. Im Serum verläuft die Reduktion des Eisens und damit seine Bindung an das Chromogen rascher als in rein wäßriger Lösung.

Zur Erstellung einer Eichkurve versetzten wir Proben des gleichen Serums mit Eisenlösungen steigender Konzentration.

Wir fanden: 100  $\gamma$ -%ige Eisenlösung:  $\frac{546}{1\text{cm}} = 0,183$ . Extinktion des Wassertestansatzes minus Extinktion des Serumtestansatzes ergibt die UEBK in  $\gamma$ -%.

c) Immunokrit [8]. Prinzip: Das Protein Transferrin wird durch ein spezifisches Antiserum präzipitiert. Die Quantität des Immunpräzipitates wird in Analogie zum Hämatokrit anhand der Höhe des Präzipitates gemessen, die der Transferrinmenge proportional ist.

Procedere: 0,1 ml Serum wird mit 0,1 ml Phosphatpuffer (Reagens 6.1) verdünnt, um dadurch in den günstigsten Be-

reich der Eichkurve zu gelangen. 0,02 ml dieser Serumverdünnung und 0,1 ml Antiserum werden auf einem mit Parafilm straff überzogenen Uhrglas mit einem stumpfen Kunststoff- oder Glasstäbchen gut verrührt. Die Menge reicht aus, um 2 Mikrohämatokrit-Capillarröhrchen (Material 4) 6—6,5 cm hoch zu füllen. Das leere Ende des Röhrchens wird unter der Sparflamme des Bunsenbrenners zugeschmolzen. Die Röhrchen bleiben mindestens 45 min bei Zimmertemperatur liegen



Abb. 1. E Extinktion;  $\circ-\circ-\circ$  Eichkurve für die Serum-eisenbestimmung, ermittelt mit Eisen-Ammon-Sulfat-Lösungen von 10 bis 300  $\gamma$ -% Eisengehalt;  $\bullet-\bullet-\bullet$  Eisen, das in Lösungen steigender Konzentration (20—500  $\gamma$ -%) Proben des gleichen Serums zugesetzt wird, erscheint bei der anschließend durchgeführten Serum-eisenbestimmung quantitativ wieder;  $\times\cdots\times$  Bestimmung der ungesättigten Eisenbindungskapazität (UEBK) unter Zugabe von Eisenlösungen steigender Konzentration zu Proben des gleichen Serums. Gradliniges Ansteigen der Extinktionswerte, also kein Einfluß der Konzentration der Eisenionen auf die Größe des UEBK-Wertes

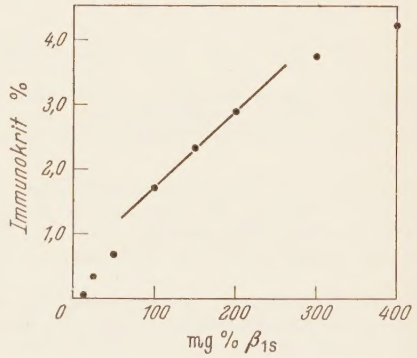


Abb. 2. Eichkurve für den Immunokrit. Wir arbeiteten weitgehend im Bereich zwischen 150 und 250 mg-% Transferrin

und werden anschließend genau 30 min lang in der Ecco-Mikrohämatokrit-Zentrifuge bei maximaler Tourenzahl (13 bis 14000 U/min) zentrifugiert. Die Höhe des Präzipitates wird mit einem Lupenmikroskop, die Höhe der Gesamtsäule (Präcipitat + flüssiger Überstand) mit einem Maßstab mit mm Teilung abgelesen.

Höhe der Präcipitatsäule  
Höhe der Gesamtsäule  $\times 100$  ist der Immunokrit. Der Mittelwert der beiden Röhrchen entspricht der halben Transferrinkonzentration der Serumprobe in mg-% (Serum 1:2 verdünnt).

d) Nephelometrie [23]. Prinzip: Die bei der Mischung von Serum und Antiserum entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe bleiben in stark verdünnten Lösungen suspendiert und streuen einfallendes Licht. Bei der gewählten Anordnung wird nicht das gestreute Licht direkt gemessen, sondern die Schwächung des durchfallenden Lichtes; es handelt sich also nicht um eine echte Nephelometrie im physikalischen Sinne.

**Procedere:** Die Serumprobe wird 1:50, das Antiserum 1:10 mit Phosphatpuffer (Reagens 6.1) verdünnt. 0,6 ml Antiserumverdünnung werden mit 0,06 ml Serumverdünnung gemischt und der Reaktionsansatz nach genau 90 min gegen einen Blindwert aus 0,6 ml Antiserumverdünnung und 0,06 ml Reagens 6.1 in Mikrocuvetten am Photometer Eppendorf mit Filter 366 nm photometriert. Hat das Serum eine starke Eigenfarbe, so muß ein zweiter Blindwert abgezogen werden, bestehend aus: 0,6 ml Reagens 6.1 + 0,06 ml Serumverdünnung gegen reines Reagens 6.1. Bei normalem Serum ist diese Korrektur nicht erforderlich. Die gemessene Extinktion, abgelesen auf einer mit reinen Transferrinlösungen hergestellten Eichkurve, ergibt die Konzentration der Serumprobe an Transferrin.

e) **Eindimensionaler Agardiffusionstest nach OUDIN [9].** Prinzip: Das Antiserum wird in Agar inkorporiert. In das antikörperhaltige Gel hinein diffundiert das frei gelöste Anti-

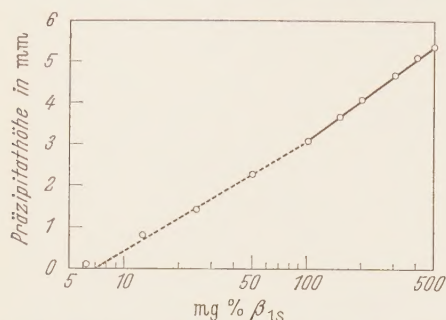


Abb. 3. Eichkurve für die Agardiffusion nach OUDIN auf semilogarithmischem Papier, da die Migrationsdistanz dem Quadrat der Transferrinkonzentration proportional ist

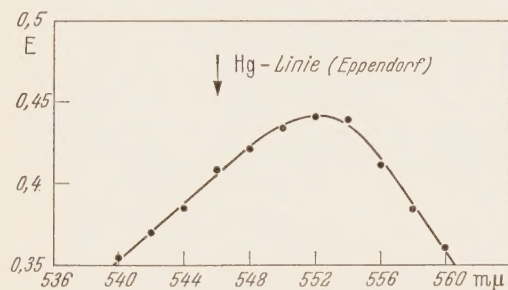


Abb. 4. Spektrophotometrische Absorptionskurve des Eisen-Terpyridin-Komplexes (208 γ-% Fe) im Wellenlängenbereich von 540–560 nm. Aufgenommen mit einem Spektrophotometer Beckman B

gen und bildet dabei ein in der Diffusionsrichtung fortschreitendes Präzipitat. Messung der Distanz der Präzipitafont vom Meniscus der Agarsäule nach fixierter Zeit; die Migrations-Distanz ist proportional dem Quadrat der Antigenkonzentration.

**Procedere:** Röhren aus Pyrexglas (Material 5) werden über Nacht in Chromschwefelsäure eingelegt, anschließend gründlich mit Wasser gespült und bei 120° C getrocknet. Ein Ende wird mit einer Leuchtgas-Sauerstofflampe zugeschmolzen. Nun werden die Röhren mit 1%igem Agar (Reagens 6.2) ausgekleidet, indem man sie mit einer lang ausgezogenen Pipette ganz füllt, sogleich den Agar wieder absaugt und die Röhren mit der Hand ausschleudert, damit möglichst wenig Agar in ihnen verbleibt. Anschließend werden sie 2 Std lang bei 120° C im Brutschrank mit der Öffnung nach unten in einem Glasgefäß stehend getrocknet. In diesem Zustand können die Röhren unbegrenzt aufbewahrt werden. Vor dem Einfüllen des Antiserums werden sie in ein Wasserbad von 48° C gebracht, ebenso das Antiserum, das mit 1/10 M Boratpuffer (Reagens 6.4) dem Antikörpertiter entsprechend verdünnt wird. (Wir haben ein Teil Antiserum mit 3 Teilen Puffer verdünnt.) Der 1%ige Agar in Phosphatpuffer (Reagens 6.3) wird im kochenden Wasserbad geschmolzen und auf 48° C abgekühlt. Nach Temperatúrausgleich werden 2 Teile Antiserumverdünnung und 1 Teil Agar gemischt und mittels einer lang ausgezogenen Pipette 2–2,5 cm hoch in die Röhren unter Vermeidung von Blasenbildung eingefüllt. Die gefüllten Röhren für 30 min ins Wasserbad zurückstellen, um eine möglichst gute Verbindung des an der Wand bereits haftenden Agars mit dem neu eingefüllten zu erreichen. Entstehen Spal-

ten zwischen Meniscus und Glaswand, so ist das Röhren nicht zu gebrauchen. Die Röhren werden nun genau senkrecht stehend in den Kühltank verbracht, bis der Agar fest erstarrt ist. Dann jedes Röhren einzeln mit Parafilm gut verschließen zum Schutz vor Austrocknung. Die Röhren werden, Öffnung nach unten, in einem als feuchte Kammer ausgekleideten Gefäß im Kühltank aufbewahrt und sind 3–4 Monate lang haltbar.

Zur Durchführung einer Bestimmung wird ein so vorbereitetes Röhren unter Vermeidung von Blasenbildung mit der zu untersuchenden Flüssigkeit — Serum, Ascites, Harn — gefüllt, wobei die Schichthöhe des Antigens 2 cm nicht unterschreiten sollte. Das Röhren wird nun, nachdem das offene Ende mit Parafilm luftdicht verschlossen ist, in einem geeigneten Halter in ein Wasserbad von 25° C verbracht, derart, daß das mit Parafilm verschlossene Ende die Wasseroberfläche um 1/2 cm überragt. Nach  $24 \pm 1/2$  Std wird die Migrationsdistanz — Unterkante des Meniscus bis Ende der Präzipitafont — mit dem Lupenmikroskop abgelesen. Da die Migrationsdistanz abhängig ist vom Quadrat der Transferrinkonzentration, wird zum Erhalten einer gradlinigen Eichkurve semilogarithmisches mm-Papier verwendet (Abb. 3).

### Ergebnisse

a) **Serumeisen-Bestimmung.** Ein Absorptionsmaximum des Eisen-Terpyridin-Komplexes liegt bei 552 nm (s. Abb. 4). Bei dieser Wellenlänge hat das Photometer Eppendorf keine Emissionslinie. Daher wurde mit Filter 546 nm gearbeitet, was nur eine geringe Verminderung der Extinktion ergab.

Zur Klärung der Frage, ob alles Eisen im Serum erfaßt werde, wurden jeweils 0,5 ml Serum mit 0,5 ml von Eisenlösungen steigender Konzentration versetzt und das Gemisch wie Serum weiter behandelt. Aus der Abb. 1 kann man entnehmen, daß bis zu einer Maximalkonzentration von 500 mg-% alles Eisen exakt wiedergefunden wird.

Ferner wurden in einem Testserum der Hyland Laboratories mit einem Sollgehalt von 105 γ-% Eisen auch tatsächlich 105 γ-% Eisen gefunden (Mittel aus 4 Bestimmungen).

Alle in der Arbeit angegebenen Serumeisenwerte wurden durch Doppelbestimmungen ermittelt, wobei das arithmetische Mittel beider Bestimmungen angegeben ist.

b) **Bestimmung der ungesättigten Eisen-Bindungs-Kapazität (UEBK).** Nach der ersten Angabe [21] inkubiert SCHADE den Reaktionsansatz während 30 min bei 45° C; später [20] modifizierte er die Inkubations-Temperatur auf 25° C. Bei 5 Seren bestimmten wir die UEBK gleichzeitig bei den beiden Inkubationstemperaturen, um einen eventuellen Unterschied zu finden (Tabelle 1).

In der Tabelle 1 sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen angegeben. Die Extinktionen bei 45° C sind bei allen Bestimmungen höher als die entsprechenden bei 25° C. Das kann zwei Gründe haben:

1. Bei 45° C wird Eisen, das an das Transferrin gebunden war, aus seiner Bindung herausgelöst und in einen Komplex mit dem Chromogen überführt.
2. Bei 25° C wird nicht alles in ionisierter Form vorliegende Eisen reduziert und kann daher auch nicht an das Chromogen gebunden werden.

Tabelle 1. Bestimmung der UEBK: Abhängigkeit der Extinktion von der Inkubations-Temperatur

|   | Serum inkubiert bei |       |
|---|---------------------|-------|
|   | 25° C               | 45° C |
| 1 | 0,167               | 0,183 |
| 2 | 0,180               | 0,214 |
| 3 | 0,263               | 0,285 |
| 4 | 0,110               | 0,131 |
| 5 | 0,199               | 0,236 |

Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Untersuchungen ausgeführt:

1. Wassertestansätze wurden bei beiden Temperaturen inkubiert. Im speziellen Fall erhielten wir im Mittel nach 30minütiger Inkubation bei 25°C eine E von 0,200 und bei 45°C eine E von 0,325. In reinem Wasser wird also unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei 25°C lange nicht alles Eisen in eine Bindung mit dem Chromogen überführt. Im Serum sind die Unterschiede aber nicht so ausgesprochen, wie der Vergleich der bei 25°C und bei 45°C inkubierten Seren zeigt (Tabelle 1).

2. In einem Serum mit einem (nach peroraler Eisengabe erreichten) Eisengehalt von 204 γ-% wurde die UEBK bestimmt, aber anstelle von 0,1 ml saurer Fe-Lösung (Reagens 6.12) lediglich 0,1 ml 0,01 n HCl zugesetzt, um festzustellen, ob unter diesen Bedingungen Eisen freigesetzt werde. Gleichzeitig haben wir den Reagentienblindwert bestimmt aus: 0,5 ml aqua bidest. + 0,1 ml 0,01 n HCl + 0,2 ml Tris-Puffer + 0,1 ml Metol + 0,1 ml Terpyridinlösung photometriert gegen einen Blindwert der gleichen Zusammensetzung, bei dem jedoch anstelle des Chromogens aqua dest. zugegeben worden war.

Alle Bestimmungen wurden sechsfach durchgeführt. Die Mittelwerte der gefundenen Extinktionen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Daraus ist ersichtlich,

Tabelle 2. Einfluß verschiedener Temperaturen auf die ungesättigte Eisen-Bindungs-Kapazität (UEBK): Versuchs-Ansatz ohne Eisenzusatz

|            |           |        |
|------------|-----------|--------|
| Reagentien | bei 45° C | 0,0065 |
| Serum      | bei 45° C | 0,0110 |
| Serum      | bei 25° C | 0,0065 |

Totale Eisenbindungs-Kapazität (TEBK) des Testserums = 295 γ-%; aktuelle Fe-Sättigung = 204 γ-%.

Tabelle 3. Bestimmung der ungesättigten Eisen-Bindungs-Kapazität (UEBK) bei 25 und 45° C: Streubereich und Standardabweichung σ

|                           | 25° C       | 45° C       |
|---------------------------|-------------|-------------|
| Anzahl der Bestimmungen   | 18          | 20          |
| Mittelwert der Extinktion | 0,271       | 0,214       |
| σ                         | 0,014       | 0,006       |
| Streubereich              | 0,241—0,290 | 0,200—0,225 |

daß bei 25°C kein Eisen aus dem Transferrin-Fe-Komplex herausgelöst wird, wohl aber bei 45°C. Der zu gut 2/3 mit Fe gesättigte Transferrin-Fe-Komplex ist also bei 25°C stabil, während durch die Inkubation bei 45°C eine gewisse Fe-Menge daraus freigesetzt wird. Nach SCHADE [19] wird ferner bei steigender Fe-Sättigung des Transferrins zunehmend leichter Fe aus der Bindung an das Protein frei.

3. Für die beiden Inkubationstemperaturen wurden durch Mehrfachbestimmungen die Standardabweichung σ und der Streubereich ermittelt. Dazu wurden zwei verschiedene Seren benutzt; beide waren frisch und stammten von gesunden Erwachsenen (Tabelle 3).

Besser noch als der Vergleich der σ-Werte und des Streubereiches zeigt ein Balkendiagramm (Abb. 5), das die Häufigkeit der einzelnen Meßwerte in der Verteilung über den Streubereich wiedergibt, die geringere Streubreite bei der Inkubation bei 45°C.

4. Ein Transferrin-Reinpräparat der Behringwerke<sup>1</sup> (Fabr. Nr. 2402) wurde untersucht. Dieses war von SCHADE getestet und als unverändert in seiner Fähigkeit, Eisen zu binden, bezeichnet worden. Hierbei erhielten wir bei 45°C Werte, die nur geringfügig unter den theoretisch erwarteten lagen (1238 γ Fe/g Transferrin anstelle von 1255 γ Fe/g β<sub>1a</sub>), bei 25°C jedoch solche, die 10% über den errechneten lagen.

Die für die Bestimmung der UEBK berechnete Standardabweichung von 7 γ-% Fe verdoppelt sich

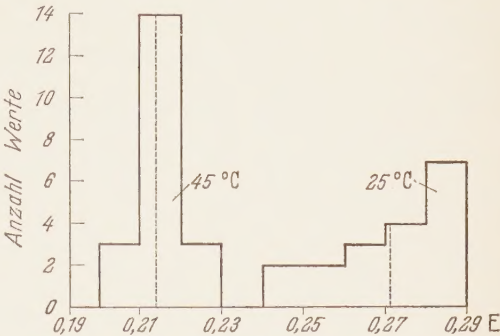


Abb. 5. Streubereich von Mehrfachbestimmungen der ungesättigten Eisenbindungskapazität (UEBK) bei 2 Seren, die bei 45°C bzw. bei 25°C inkubiert wurden. Bedeutend günstigere Verhältnisse bei 45°C. Die punktierte Linie zeigt den jeweiligen Mittelwert an. E Extinktion

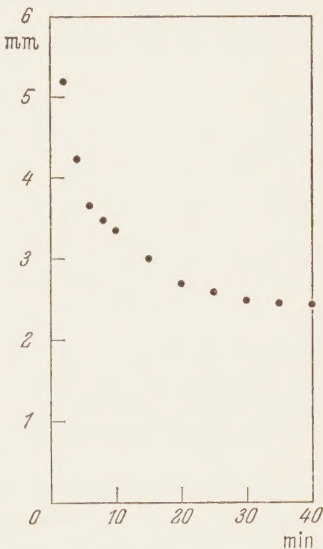


Abb. 6. Immunokrit: Die Höhe der Präcipitatsäule sinkt mit steigender Zentrifugationsdauer. Konstante Höhe nach 40 min

für die gesamte Methode, da bei der Messung der zugegebenen Fe-Menge der gleiche Fehler wieder erscheint; d.h. σ für UEBK = ± 14 γ-%.

c) Immunokrit. Die Art des zur Serumverdünnung benutzten Puffers ist von nur geringem Einfluß auf den Immunokrit. Wir verglichen Tris-Puffer pH 8,5, Phosphatpuffer pH 7,5 und pH 5,3 und Acetatpuffer pH 4,4. Mit sinkendem pH stieg der Immunokrit-Wert nur unbedeutend an.

Der Antigen-Antikörper-Komplex benötigt zu seiner maximalen Ausfällung mindestens 30 min. Zentrifugiert man zu früh, erhält man zu niedrige Werte.

Die Zentrifugationsdauer sollte genau eingehalten werden. Abb. 6 zeigt, daß man erst nach ca. 30minüti-

<sup>1</sup> Herrn Prof. H. E. SCHULTZE, Behringwerke AG, Marburg a. d. Lahn (Deutschland), möchten wir vielmals danken für die freundliche Überlassung hochgereinigter Transferrin-Präparate.

gem Zentrifugieren eine einigermaßen konstant bleibende Höhe der Präcipitatsäule erreicht, so daß sich von nun an Abweichungen von der vorgeschriebenen Zeit nur noch unwesentlich auswirken.

Das günstigste Verhältnis von Serum zu Antiserum im Reaktionsansatz ist abhängig vom Antikörper-Titer und muß daher für jedes Antiserum neu bestimmt werden. Versetzt man konstante Antiserummengen

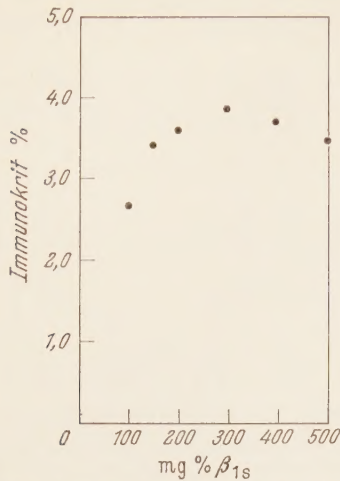


Abb. 7. Immunokrit: Antiserum wird mit Transferrin-Lösungen steigender Konzentration versetzt. Bei Transferrinkonzentrationen ( $\beta_{1s}$ ) über 300 mg-% sinkt der Immunokrit wieder ab (Heidelbergsche Präcipitationskurve)

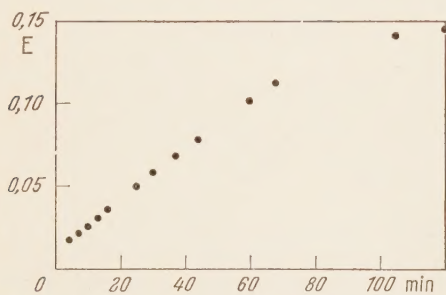


Abb. 8. Nephelometrie: Zunahme der Trübung (Anstieg der Extinktion) des Serum-Antiserum-Reaktionsansatzes vom Zeitpunkt der Mischung an. Anstieg der Extinktion noch nach 2 Std. E Extinktion

mit gleichen Volumina von Antigenlösungen steigender Konzentration, erhält man die bekannte Präcipitationskurve nach Heidelberger. Zuverlässige Meß-Ergebnisse sind nur auf dem aufsteigenden, steilen Schenkel der Kurve zu erwarten (Abb. 7).

d) *Nephelometrie.* Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit der Trübungsintensität von der Zeitdauer der Entwicklung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Erst nach 90 min verlangsamt sich die Reaktionsgeschwindigkeit so weit, daß kleine Ungenauigkeiten bei der Einhaltung der Reaktionszeit beim Photometrieren nicht mehr wesentlich ins Gewicht fallen. Andere

Autoren [1, 23] fanden mit anderen Antigen-Antikörper-Systemen schon nach 10—15 min eine Konstanz der Trübung. Bei uns zeigte sich aber bei den verschiedensten Verdünnungen von Serum und Antiserum noch nach 2 Std nach Mischung ein geringgradiger Extinktionsanstieg. Das unterschiedliche Verhalten muß in Unterschieden der individuellen Antiseren zu suchen sein.

SCHULTZE [23] photometriert bei 450 nm. Wir erzielten jedoch bei 366 nm steiler verlaufende Eichkurven, ohne einen gesteigerten Einfluß der Serum-eigenfarbe festzustellen, weshalb wir die kürzere Wellenlänge benutzten.

e) *Eindimensionale Agardiffusion nach OUDIN.* Entgegen früheren Angaben zeigte es sich, daß Temperaturschwankungen einen starken Einfluß auf die Migrationsdistanz der Präcipitatfront ausüben, weshalb man unbedingt bei konstanter Temperatur (Thermostat!) arbeiten sollte.

Das Hauptproblem stellt die Erstellung einer zuverlässigen Eichkurve dar. Mit verschiedenen Proben von Transferrin-Reinpräparaten der Behringwerke erhielten wir annähernd parallele Eichkurven, deren Parallelverschiebung jedoch so groß ist, daß die Ergebnisse bis zu 90 % differieren. So ist die Bestimmung der absoluten Menge des Proteins Transferrin sehr unsicher. Benutzt man jedoch auf ein Eichpräparat bezogene Normalwerte, erhält man sehr gut reproduzierbare Ergebnisse im klinischen Routinebetrieb.

Zwei Präparate, A (Fabr.-Nr. 2501) und B (Fabr.-Nr. 2402), untersuchten wir näher: Die elektrophoretische Beweglichkeit war bei beiden gleich. Die A-Bande war etwas breiter als die von B, und bei A war ein deutliches Nachschleppen von Protein zwischen Auftragsstelle und der Bande („trailing“) sichtbar, das bei B praktisch fehlte. A band 1156  $\gamma$  Fe/g Transferrin, B 1238  $\gamma$  Fe/g Transferrin. (Theoretisch zu erwartende totale Eisenbindungsfähigkeit: 1255  $\gamma$ /g Transferrin.) A fixierte also 6,6 % weniger Eisen als B. Aus der mit Präparat A aufgestellten Eichkurve ergeben sich um 20 % höhere Absolutwerte als aus Eichkurve B.

f) *Vergleichende Untersuchungen.* Für jede benutzte Methode bestimmten wir den Streubereich und die Standardabweichung  $\sigma$  durch Mehrfachbestimmungen desselben individuellen Serums (Tabelle 4). Allerdings war die Prüfung sämtlicher Methoden an ein und demselben Serum nicht möglich, da uns von keinem Einzel-Individuum dafür genügende Mengen zur Verfügung standen. Alle Seren waren frisch und klar.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß von den immunologischen Methoden im Hinblick auf  $\sigma$  und den Streubereich die Agardiffusion bei uns am günstigsten, die Nephelometrie am ungünstigsten ist.

Tabelle 4. Reproduzierbarkeit der benutzten Methoden

|                           | Serum Fe          | UEBK                     | Immunokrit   | Nephelometrie | Oudin        |
|---------------------------|-------------------|--------------------------|--------------|---------------|--------------|
| Anzahl der Bestimmungen   | 14<br>je 0,25 ml  | 20                       | 20           | 20            | 21           |
| Mittelwert                | 57 $\gamma$ -%    | 157 $\gamma$ -%          | 340 mg-%     | 337 mg-%      | 312 mg-%     |
| $\sigma$                  | 1,4 $\gamma$ -%   | 2 $\times$ 7 $\gamma$ -% | 10 mg-%      | 14 mg-%       | 9 mg-%       |
| Streubereich              | 55—59 $\gamma$ -% | 145—172 $\gamma$ -%      | 322—360 mg-% | 306—358 mg-%  | 306—335 mg-% |
| Differenz der Extremwerte | 4 $\gamma$ -%     | 27 $\gamma$ -%           | 38 mg-%      | 52 mg-%       | 29 mg-%      |

### Diskussion

Aus unseren Erfahrungen und dem Vergleich mit der Literatur gelangen wir zu folgender Beurteilung der hier verwendeten Methoden:

a) *Die chemischen Methoden.* 1. *Das Serumeisen.* Außer der von uns benutzten Methode von SCHADE [20, 21] (photometrische Bestimmung des Eisens als Terpyridin-Eisen-Komplex im angesäuerten, nativen Serum) stehen noch andere zur Verfügung, deren Grundprinzipien folgendermaßen charakterisiert werden können:

α) *Enteweißung des Serums und photometrische Eisenbestimmung im Überstehenden.* Diese Techniken [3, 6, 14, 16, 25] haben alle den Nachteil eines relativ hohen Arbeitsaufwandes.

β) Bei anderen Methoden (hierzu gehört auch die von uns benutzte) wird die Eisenbestimmung im nicht enteweißten Serum durchgeführt. Eine einfache und schnelle Methode wurde von WILLIAMS [26] angegeben. Es handelt sich um eine semiquantitative Technik: Das an das Transferrin gebundene Eisen wird freigesetzt und an ein Chromogen gebunden; der Eisen-Chromogen-Komplex wird dann an ein Harz adsorbiert und die Farbintensität des Teströhrchens mit der von Standardröhrchen mit bekanntem Eisengehalt verglichen. Wir glauben, daß überall dort, wo ein Photometer zur Verfügung steht, die Methode von SCHADE wegen ihrer Exaktheit zu bevorzugen ist, wenn sie auch etwas mehr Zeit erfordert.

γ) WARBURG hat 1927 eine theoretisch sehr interessante Methode angegeben [27]. Er bestimmte quantitativ die Katalysatorwirkung des Eisens auf die Oxydation von Cystein unter Messung des Sauerstoffverbrauches. Die Technik ist jedoch sehr schwierig, so daß diese Methode für eine praktische Anwendung nicht in Betracht kommt.

Unter Abwägung von Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und technischen Anforderungen scheint uns für die Routine die von SCHADE angegebene Technik am geeignetsten zu sein.

2. *Zur Bestimmung der ungesättigten Eisen-Bindungs-Kapazität (UEBK) bzw. der totalen Eisen-Bindungs-Kapazität (TEBK)* stehen neben der von SCHADE [20, 21] beschriebenen vor allem folgende zwei weitere Techniken zur Verfügung:

α) *Zugabe von Eisen zu Serum und direkte Messung der Extinktion des lachsroten Eisen-Transferrin-Komplexes* [18]. Diese Methode hat eine relativ große Fehlerbreite.

β) *Zugabe von Eisen im Überschuß über die UEBK, Absorption des nicht an das Transferrin gebundenen Eisens und anschließende Durchführung einer Serum-eisenbestimmung* [4, 14, 15, 17]. Diese Techniken zeigen eine gute Reproduzierbarkeit, erfordern aber relativ großen Arbeitsaufwand.

Diese Methode von SCHADE zeigt eine gleich gute Reproduzierbarkeit wie die unter β) angegebenen Techniken. Mit ihr bestimmten wir jedoch bei drei Patienten mit Thalassämie bzw. Fanconi-Panmyelopathie eine negative UEBK, also die TEBK niedriger als das Serum-Eisen. Das Serum-Eisen dieser Fälle war erhöht, die TEBK erniedrigt. Dieser Befund läßt sich nur mit der Herauslösung von Eisen aus dem Transferrin-Eisen-Komplex (s. Tabelle 2) bei der Inkubation bei 45°C deuten. Die Annahme eines effektiv die TEBK überschreitenden Eisenspiegels ist unwahrscheinlich,

da freies Eisen im Serum extrem toxisch wirkt. Bei der Inkubation bei 25°C andererseits wurde die UEBK bei einem Transferrinreinpräparat um 10 % höher als errechnet bestimmt. So kommen wir zu der Meinung, daß einerseits bei 45°C zwar eine kleine Menge Eisen aus der Bindung mit dem Transferrin herausgelöst wird, daß aber andererseits bei 25°C nicht alles freie Eisen an das Chromogen gebunden wird. Die Verhältnisse sind bei 45°C jedoch in jeder Hinsicht günstiger. Auch die Methode von SCHADE erscheint uns noch zu aufwendig für die Benutzung im Routinelabor. So ergibt sich das unbefriedigende Bild: Auf der einen Seite mäßige Genauigkeit, auf der anderen viel Arbeit.

b) *Die immunochemischen Methoden* beruhen alle auf dem gleichen Prinzip, nämlich der Präzipitation

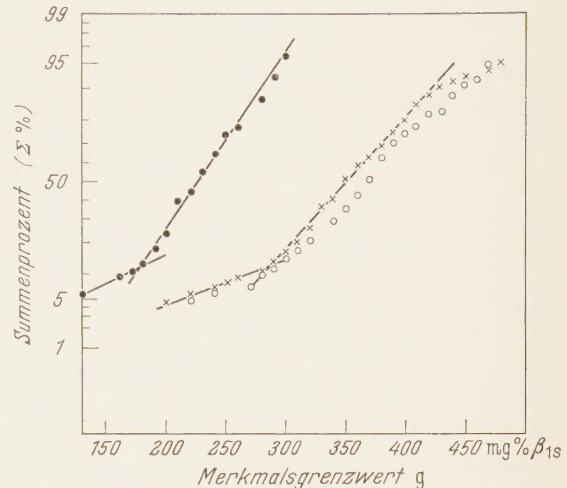


Abb. 9. Die Transferrinkonzentration aller von uns untersuchten Seren ist im Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragen. ● Chemische Methode nach SCHADE; ○ Agardiffusion; × Immunokrit. Gute Übereinstimmung der immunologischen Techniken. Die chemische Methode ergibt gegenüber den immunologischen niedrigere Werte und einen geringeren Streubereich

des betreffenden Antigens durch ein spezifisches Antiserum. Fehler, die auf diesem Prinzip basieren, werden also bei allen Modifikationen auftauchen. Für alle diese Methoden ist unabdingbare Voraussetzung ein wirklich spezifisches Antiserum, fernerhin auf ein bestimmtes Eichpräparat, eventuell auch auf ein individuelles Antiserum bezogene Normalwerte. Vorteile der immunologischen Methoden sind: 1. die geringe benötigte Materialmenge, 2. daß mit normalem, eisenhaltigem Instrumentarium gearbeitet werden kann, 3. besonders hohe Empfindlichkeit in tiefen Konzentrationsbereichen. Die Hauptschwierigkeit ergab sich bei der Erstellung von Eichkurven mit kristallisierten Transferrinreinpräparaten. Die Kurven von verschiedenen Präparaten zeigten Parallelverschiebungen von einem derartigen Ausmaß, daß bei der eindimensionalen Agardiffusionsmethode der zu einer bestimmten Migrationsdistanz gehörende Absolutwert der Transferrinkonzentration sich bis zu 90 % unterschied, je nach Ablesung auf der einen oder anderen Kurve. Kleine Beimengungen denaturierten Proteins oder geringfügige Veränderungen an der Tertiärstruktur der Proteine scheinen die immunologischen Eigenschaften eines Präparates schon stark zu verändern.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, empfehlen wir, in einem Pool von frischen Normalseren die TEBK chemisch nach SCHADE zu bestimmen und mit den Verdünnungen eines solchen Normalserums die

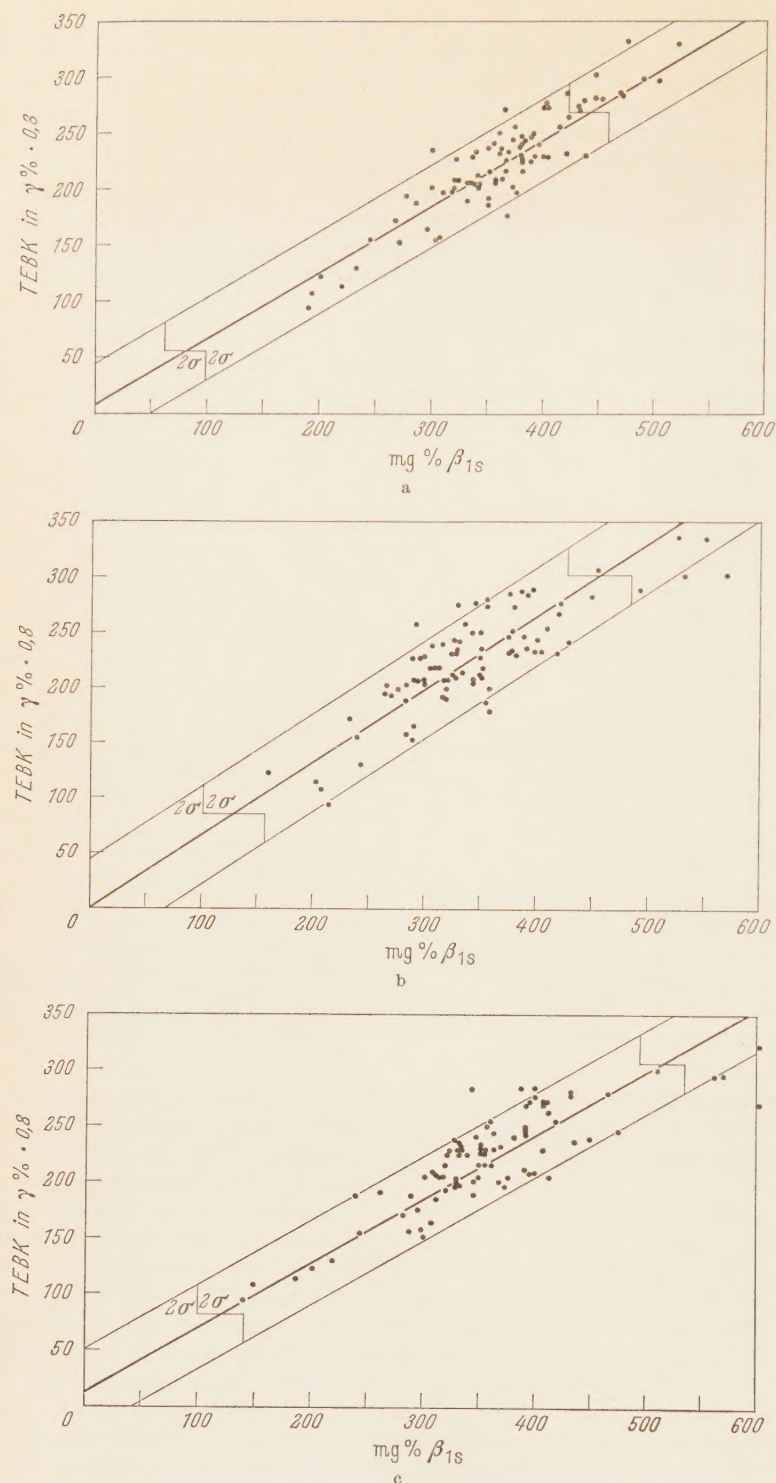


Abb. 10a—c. Gegenüberstellung der mit der chemischen Methode nach SCHADE (Ordinate) und den immunologischen Methoden (Abszisse) an den gleichen Seren bestimmten Transferrinkonzentrationen. Werte der immunologischen Methoden in mg-% Transferrin, Werte der chemischen Methode in  $\gamma$ -% totale Eisen-Bindungs-Kapazität (TEBK)  $\times 0,8$ , da die TEBK in  $\gamma$ -%  $\times 0,8$  numerisch gleich ist der entsprechenden Transferrinkonzentration in mg-%. Innerhalb der Kurvenschar müssen mindestens 95 % der ermittelten Werte liegen, wenn eine konstante Korrelation zwischen den Methoden vorliegt. a Vergleich chemische Methode — Agardiffusion nach OUDIX. b Vergleich chemische Methode — Immunokrit. c Vergleich chemische Methode — Nephelometrie

Eichung der immunologischen Methode durchzuführen. Das zur Eichung verwendete Normalserum wird im Routinebetrieb als Kontrolle regelmäßig mitbestimmt. c) Vergleich der chemischen und immunologischen Methoden. Die Transferrinwerte der 86 Seren, die wir mit den immunologischen Techniken einerseits, der

chemischen Methode andererseits bestimmten, wurden einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse der vier Methoden wurden zuerst auf Wahrscheinlichkeitspapier aufgetragen (Abb. 9). Dabei zeigen die immunologischen Methoden im signifikanten Bereich von 5—95 % der Bestimmungsergebnisse eine zufriedenstellende Übereinstimmung in der Verteilung über den untersuchten Streubereich. Die Kurve der chemischen Methode ist gegenüber den immunologischen stark nach links in den Bereich niedrigerer Werte verschoben; sie hat ferner einen steileren Verlauf, was gleichbedeutend mit geringerer Streubreite ist. Alle Kurven zeigen einen gradlinig flachen Verlauf bis zu durchschnittlich 12 % der Ergebnisse, die im Bereich der pathologisch erniedrigten Werte liegen.

Auf mm-Papier wurden jeweils in einem gesonderten Diagramm die Ergebnisse einer der immunologischen Methoden den zugehörigen der chemischen Methode gegenübergestellt. Nach Augenmaß wurde eine Ausgleichsgerade durch die Punkteschar gelegt derart, daß sie bei der Nephelometrie durch den Nullpunkt des Koordinatensystems verläuft, bei der Agardiffusion und dem Immunokrit, entsprechend den Nullwerten der Eichkurven, den positiven Teil der Ordinate schneidet. Parallel zur Ausgleichsgeraden, im Abstand  $\sqrt{4\sigma_1^2 + 4\sigma_2^2}$  ( $\sigma_1$  = chemische Methode,  $\sigma_2$  = jeweilige immunologische Methode) von ihr werden ober- und unterhalb je eine Parallele eingezeichnet. Die Kurvenschar wird so gedreht, daß möglichst viele Punkte in dem von den Parallelen umschlossenen Raum liegen. Fixierter Drehpunkt ist der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Ordinate. Sofern die mit frischem Normalserum gewonnenen  $\sigma$ -Werte repräsentativ für das ganze Material sind, und eine konstante Korrelation zwischen den Methoden besteht, dürfen nur 5 % aller Werte, das sind bei 86 Bestimmungen 4, außerhalb der Parallelen liegen. Das trifft nur für die Agardiffusion zu. Beim Immunokrit liegen 7 % aller Werte außerhalb, bei der Nephelometrie 9 %. Das könnte daraus zu erklären sein, daß die Seren vor der nephelometrischen Bestimmung zum guten Teil zweimal aufgetaut worden waren und daher durch den Blindwert nicht exakt eliminierbare Trübungen zeigten, während das Serum für die Bestimmung von  $\sigma$  frisch und klar war. Die Nephelometrie hat nicht nur die größte Standardabweichung unter den immunologischen Methoden mit einem frischen Serum, sondern außerdem ist  $\sigma$  im Gesamtmaterial nicht repräsentativ (9 % der Werte außerhalb) (Abb. 10a—c).

Die graphisch ermittelten Gleichungen für die Ausgleichsgeraden lauten:

$y$  = Wert der chemischen Methode (in mg-% Transferrin durch Umrechnung der TEBK auf die entsprechende Transferrinmenge).

$x$  = Wert der jeweiligen immunologischen Methode (in mg-%).

Eindimensionale Immunodiffusion nach OUDIN:

$y = 0,598 x + 7$

Immunokrit  $y = 0,578 x + 12$

Nephelometrie.  $y = 0,655 x$ .

Rechnerisch wurde ein Korrelationsfaktor zwischen den Werten der chemischen Methode und den Ergebnissen der immunologischen Methoden ermittelt, indem wir das Ergebnis der chemischen Methode minus Nullwert der betreffenden immunologischen Methode durch den dazugehörigen immunologischen Wert dividierten, den Mittelwert des Faktors, seine Standardabweichung  $\sigma$  und seinen Streubereich ermittelten (Tabelle 5).

Tabelle 5. Die Korrelationsfaktoren zwischen der chemischen und den immunologischen Methoden

|               |         |                  |                      |
|---------------|---------|------------------|----------------------|
| Chemie        | = 0,597 | $\sigma$ : 0,053 | Bereich: 0,457—0,726 |
| OUDIN         |         |                  |                      |
| Chemie        | = 0,598 | $\sigma$ : 0,065 | Bereich: 0,457—0,798 |
| Immunokrit    |         |                  |                      |
| Chemie        | = 0,655 | $\sigma$ : 0,083 | Bereich: 0,437—0,873 |
| Nephelometrie |         |                  |                      |

Tabelle 6. Praktisch wichtige Einzelheiten der benutzten Methoden

|                                                                            | Serum Fe + UEBK                                                       | Oudin-Agardiffusion                                                                                                                                  | Immunokrit                             | Nephelometrie |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------|
| Benötigte Serummenge/<br>Bestimmung                                        | 1—2 ml                                                                | 0,2—0,3 ml                                                                                                                                           | 0,1 ml                                 | 0,1 ml        |
| Unkosten                                                                   | großer Verbrauch an<br>teurem aqua dest. und<br>bidest., sonst gering | gering                                                                                                                                               | rel. großer Verbrauch<br>von Antiserum | gering        |
| Arbeitszeitaufwand                                                         | 45 min                                                                | 5 min für Bestimmung<br>selbst, ca. 15 min für Vor-<br>bereitung der Röhrchen,<br>wenn sie in einer größeren<br>Serie (70—100) hergestellt<br>werden | 20 min                                 | 20 min        |
| Zeit vom Ansetzen der<br>Bestimmung bis zum Vor-<br>liegen des Ergebnisses | 1 Std                                                                 | 24 Std                                                                                                                                               | 90 min                                 | 105 min       |
| Güte der benötigten<br>Arbeit                                              | sehr groß                                                             | minimal für Bestimmung<br>selbst, groß für Vorberei-<br>tung der Röhrchen                                                                            | mittel                                 | mittel        |
| Reproduzierbarkeit                                                         | gut                                                                   | gut                                                                                                                                                  | befriedigend                           | mäßig         |

Es zeigt sich, daß die Standardabweichung  $\sigma$  und der Streubereich bei der Agardiffusionsmethode am günstigsten sind.

d) *Abschließende Beurteilung.* Da sich für die Bestimmung der TEBK bzw. des Transferrins eine befriedigend konstante Korrelation zwischen den immunologischen Methoden und der chemischen ergibt, ist es erlaubt, anstelle der TEBK die Transferrinmenge direkt zu bestimmen. Bei der guten Reproduzierbarkeit und dem relativ geringen Arbeitsaufwand der Agardiffusionsmethode empfehlen wir diese für die Bestimmung des Transferrins bzw. der TEBK.

*Zusammenfassung.* In 86 Serumproben wurden folgende Bestimmungen durchgeführt: Serumeisen und ungesättigte Eisenbindungskapazität (UEBK), jeweils als Doppelbestimmung mit den Methoden von SCHADE [20, 21]; Transferrin mit drei immunologi-

schen Methoden: Agardiffusion nach OUDIN [9], Immunokrit [8] und Nephelometrie nach SCHULTZE und SCHWICK [23]. Von jeder Methode wurde durch 20- bzw. 14fache Bestimmung ein und desselben Serums die mittlere Abweichung vom Mittelwert  $\sigma$  ermittelt. Es ergaben sich folgende  $\sigma$ -Werte: Serumeisen: 1,4  $\gamma$ -%, UEBK: 14  $\gamma$ -%, Agardiffusion: 9 mg-%, Immunokrit: 10 mg-%, Nephelometrie: 14 mg-%. Die aus dem Serumeisen und der UEBK ermittelte totale Eisen-Bindungs-Kapazität (TEBK) wird auf die entsprechende Transferrinmenge umgerechnet, und die Werte werden statistisch mit den Ergebnissen der immunologischen Bestimmungen verglichen. Die immunologischen Werte liegen alle bedeutend höher als die über die TEBK gewonnenen. Es ergibt sich jedoch eine konstante Korrelation, die beim Vergleich mit der Agardiffusion am ausgeprägtesten ist. Es gilt folgende Umrechnungsformel: Transferrinkonzentration über TEBK = 0,598  $\times$  Transferrinkonzentration über Agardiffusion + 7. Wir empfehlen zur Bestimmung des Transferrins und der TEBK nach Berücksichtigung aller praktisch wichtigen Faktoren die Agardiffusionsmethode nach OUDIN.

*Summary.* The following determinations were performed in 86 serum samples: Serum-iron and unsaturated iron-binding-capacity (UIBC), in double determinations (SCHADE [20, 21]). Transferrin by 3 immunological methods: 1. Agar gel diffusion (OUDIN [9]),

2. Immunocrit [8], 3. Turbidity test (SCHULTZE and SCHWICK [23]). The reproducibility of each method was estimated by 20 (14) determinations of the same serum sample. We found the following  $\sigma$  values: Serum iron: 1,4  $\gamma$ -%; UIBC: 14  $\gamma$ -%; agar gel diffusion: 9 mg-%; immunocrit: 10 mg-%; turbidity test: 14 mg-%. The total iron-binding-capacity (TIBC) = serum iron + UIBC corresponds to calculated amounts of transferrin, which are compared with the results of the immunological determinations. The immunological values are consistently higher than those obtained by the TIBC. There is however a constant correlation, which is the closest between the agar gel diffusion technique and the TIBC. The following conversion formula was calculated: Transferrin concentration by TIBC = 0,598  $\times$  transferrin concentration by agar gel diffusion + 7. Considering all the factors involved

we recommend for the quantitative routine estimation of transferrin and TIBC the agar gel diffusion technique according to OUDIN.

**Literatur.** [1] AUGENER, W.: Persönliche Mitteilung. — [2] DREYFUS, J. C., et G. SCHAPIRA: Siderophile. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **37**, 541 (1955). — [3] FISCHER, D. S., and D. C. PRICE: A simple serum iron method using the new sensitive chromogen Tripyridyl-s-triazine. Clin. Chem. **10**, 21 (1964). — [4] FRIED, R., u. J. HOEFLMAYR: Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung der totalen Eisen-Bindungskapazität. Klin. Wschr. **42**, 645 (1964). — [5] HARRIS, H., D. G. PENINGTON, E. B. ROBSON, and C. R. SCRIVER: A further genetically determined transferrin variant in man. Ann. hum. Genet. **24**, 327 (1960). — [6] HEILMEYER, L., u. K. PLÖTNER: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: Gustav Fischer 1937. — [7] HEILMEYER, L., W. KELLER, u. O. VIVELL: Kongenitale Atransferrinämie bei einem 7 Jahre alten Kind. Dtsch. med. Wschr. **86**, Nr 37 (1961). — [8] HEISKELL, C. L., R. T. FISK, W. H. FLORSHEIM, A. TACHI, J. R. GOODMAN, and C. M. CARPENTER: A simple method for quantitation of serum beta-lipoproteins by means of immunocrit. Amer. J. clin. Path. **35**, 222 (1961). — [9] HITZIG, W. H.: Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963. — [10] HITZIG, W. H.: Zur quantitativen Bestimmung spezifischer Proteinfractionen. Int. Arch. Allergy **19**, 145, 284 (1961). — [11] HITZIG, W. H., M. SCHMID, K. BETKE, u. M. ROTHSCHILD: Erythroleukämie mit Hämoglobinopathie und Eisenstoffwechselstörung. Helv. paediat. Acta **15**, 203 (1960). — [12] HOLMBERG, C. G., and C.-B. LAURELL: Studies on the capacity of serum to bind iron. A contribution to our knowledge of the regulation mechanism of serum iron. Acta physiol. scand. **10**, 307 (1945). — [13] KOEHLIN, P. A.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXXVIII. The  $\beta$ -1-metal-combining protein of human plasma. J. Amer. chem. Soc. **74**, 2649 (1952). — [14] LAURELL, C.-B.: Studies on the transportation and metabolism of iron in the body. Acta physiol. scand. **14**, Suppl. 46

(1947). — [15] NETH, R., K. H. SCHÄFER, P. DILLY, u. E. LAAR: Untersuchungen zur mikrochemischen Bestimmung der latenten und totalen Eisenbindungskapazität im Serum. Klin. Wschr. **41**, 1087 (1963). — [16] RAMSAY, W. N. M.: The determination of iron in blood plasma or serum. Clin. chim. Acta **2**, 214 (1957). — [17] RAMSAY, W. N. M.: The determination of the total iron-binding-capacity of serum. Clin. chim. Acta **2**, 221 (1957). — [18] RATH, C. E., and C. A. FINCH: Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXXVIII. Serum iron transport. Measurement of iron binding capacity of serum in man. J. clin. Invest. **28**, 79 (1949). — [19] SCHADE, A. L.: Significance of serum iron for the growth, biological characteristics and metabolism of *Staphylococcus aureus*. Biochem. Z. **338**, 140 (1963). — [20] SCHADE, A. L.: Methods applicable to the study of siderophilin. Behringwerk-Mitt. **39**, 130 (1961). — [21] SCHADE, A. L., J. OYAMA, R. W. REINHART, and J. R. MILLER: Bound iron and unsaturated iron-binding capacity of serum; Rapid and reliable quantitative determination. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) **87**, 443 (1954). — [22] SCHADE, A. L., and L. CAROLINE: An iron-binding component in human blood plasma. Science **104**, 340 (1946). — [23] SCHULTZE, H. E., and G. SCHWICK: Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen. In: Protides of the biological fluids. 6th Colloquium, Bruges 1958, p. 15 (ed. H. PEETERS). Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1959. — [24] SCHULTZE, H. E., K. HEIDE, u. H. MÜLLER: Über Transferrin/Siderophilin. Behringwerk-Mitt. **32** (1957). — [25] VAHLQUIST, B.: Das Serumeisen. Acta paediat. (Uppsala) **38**, Suppl. 5 (1941). — [26] WILLIAMS, H. L., P. R. ANDERSON, M. E. CONRAD, and W. H. CROSBY: A rapid method of measuring the iron concentration in serum or plasma. J. Lab. clin. Med. **63**, 703 (1964). — [27] WARBURG, O.: Methode zur Bestimmung von Kupfer und Eisen und über den Kupfergehalt des Blutserums. Biochem. Z. **187**, 255 (1927).

M. N. BAMBACH  
Kinderspital Zürich, Eleonorenstiftung  
Univ.-Kinderklinik  
8032 Zürich, Steinwiesstr. 75

## Verdankung

Herrn Professor Dr. W. H. HITZIG möchte ich vielmals danken für seinen allzeit bereiten Rat und für seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

## Curriculum vitae

Am 13. 11. 1939 in Darmstadt (Deutschland) als Sohn des Baurats i. R. Dr.-Ing. RICHARD BAMBACH und seiner Ehefrau ELISABETH, geb. HERMANN, geboren. Am 16. 2. 1959 Abitur am Ludwig-Georgs-Gymnasium (altsprachliches Gymnasium) in Darmstadt.

SS 1959: Beginn des Medizinstudiums in Frankfurt a. M.

24. 3. 1960: Erstes propädeutisches Examen an der Universität Frankfurt a. M.

12. 10. 1961: Zweites propädeutisches Examen an der Freien Universität Berlin.

Nach klinischem Studium in München, Zürich und Freiburg i. Br. Staatsexamen an der letztgenannten Universität im Herbst 1965.

